

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-173123

(43)Date of publication of application : 11.07.1995

(51)Int.Cl.

C07C235/76
A61K 31/22
A61K 31/405
C07D209/20

(21)Application number : 04-206802

(71)Applicant : MERCK & CO INC

(22)Date of filing : 03.08.1992

(72)Inventor : BERGSTROM JAMES D
HARRIS GUY H
HUANG LEEYUAN
JENKINS ROSALIND F
JONES E TRACY T
KONG YU LIN
MEINZ MARIA SANDRINO
OMSTEAD MARY N
DIEZ MARIA TERESA
PELAEZ FERNANDO
MILLIGAN JAMES A
ONISHI JANET C
LINGHAM RUSSELL B
ZINK DEBORAH

(30)Priority

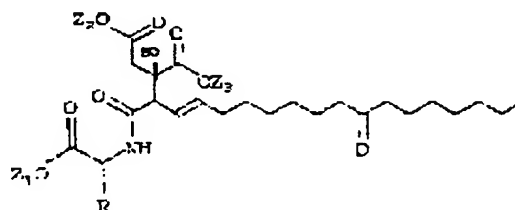
Priority number : 91 739950	Priority date : 02.08.1991	Priority country : US
91 739758	02.08.1991	
91 739932	02.08.1991	US
92 907730	09.07.1992	US
		US

(54) CHOLESTEROL-LOWERING AGENT

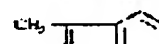
(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel compound which is a squalene synthase inhibitor, is useful as a cholesterol-lowering agent or also as an antifungal agent, is also an inhibitor for farnesyl protein transferase and the farnesylation of oncogenic proteins, and is effective in the treatment of cancer.

CONSTITUTION: There is provided a compound of formula I (wherein R is p- hydroxybenzyl, benzyl, or formula II; Z1 to Z3 are each H, a 1-5C alkyl or a 1-5C alkyl substituted with a phenyl not substituted or substituted with methyl, methoxyl, Cl, Br, I, F or OH) or a pharmaceutically acceptable salt thereof. This compound can be obtained by culturing *Trichoderma viride* MF5628



BEST AVAILABLE COPY



(ATCC74084) or a variant thereof under conditions favorable for the formation of the compound and isolating the compound from the culture. The compound can be used in combination with a pharmaceutically acceptable nontoxic actionic polymer which can bind with bile acid in a form not re-adsorbed by the gastrointestinal tract (e.g. cholestyramine) and can be administered together with another cholesterol-lowering agent (e.g. HMG-CoA reductase inhibitor).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.03.1993

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 09.10.1996

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-173123

(43) 公開日 平成7年(1995)7月11日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 C 235/76		7106-4H		
A 6 1 K 31/22	ADN	9454-4C		
31/405				
C 0 7 D 209/20		8217-4C		

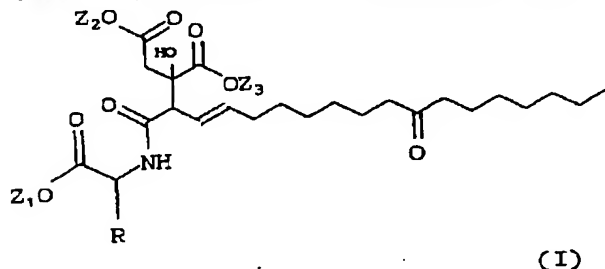
審査請求 有 請求項の数10 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願平4-206802	(71) 出願人	390023526 メルク エンド カムパニー インコーポ レーテッド MERCK & COMPANY INC OPERATED アメリカ合衆国、ニュージャージー、ロー ウエイ、イースト リンカーン アヴェニ ュー 126
(22) 出願日	平成4年(1992)8月3日	(72) 発明者	ジェームス デー、ベルグストロム アメリカ合衆国、08853 ニュージャーシ イ、ネシャニック ステーション、ロヒル ロード 60
(31) 優先権主張番号	7 3 9 9 5 0	(74) 代理人	弁理士 岡部 正夫 (外5名)
(32) 優先日	1991年8月2日		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	7 3 9 7 5 8		
(32) 優先日	1991年8月2日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	7 3 9 9 3 2		
(32) 優先日	1991年8月2日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

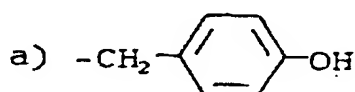
(54) 【発明の名称】 コレステロール低下剤

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 トリコデルマ・ピリデが生産する一般式 I



【Rは



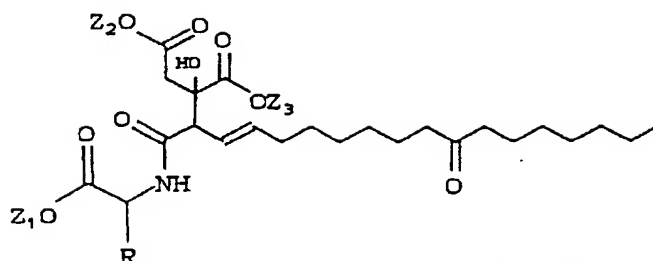
等で、Z₁、Z₂及びZ₃は独立してa) H、b) C₁ - 5 アルキル又は、c) i) フェニル又はii) メチル、メトキシ、ハロゲン又はヒドロキシで置換されたフェニルで置換されたC₁ - 5 アルキルである) の化合物及びその製造法。

【効果】 スクアレンシンターゼ阻害剤であってコレス

テロール低下剤として、さらに抗真菌剤として有用であり、またファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ及び癌遺伝子タンパク質 R a s のファルネシル化の阻害剤であって癌の治療に有効である。

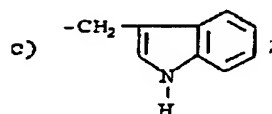
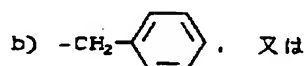
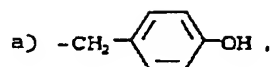
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 構造式 (1)



【式中 R は

【化 2】

であり; Z_1 、 Z_2 及び Z_3 は各々独立して

a) H

b) C_{1-5} アルキル又は

c) i) フェニル、又は

ii) メチル、メトキシ、Cl、Br、I、F 又はヒドロキシで置換されたフェニルで置換された C_{1-5} アルキルである] を有する化合物又は式 (1) の化合物の薬学的に許容しうる塩。

【請求項 2】 Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々水素である請求項 1 記載の化合物又はその薬学的に許容しうるモノ、ジ又はトリ塩。

【請求項 3】 Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々メチルである請求項 1 記載の化合物。

【請求項 4】 請求項 1 記載の化合物の非毒性の治療的に有効な量及び薬学的に許容しうる担体からなる医薬組成物。

【請求項 5】 胃腸管に再吸収されない形で胆汁酸を結合することができる薬学的に許容しうる非毒性カチオンポリマーと組合わせた請求項 1 記載の化合物の非毒性の治療的に有効な量及び薬学的に許容しうる担体とからなる医薬組成物。

【請求項 6】 a) HMG-CoA 還元酵素阻害剤、

b) HMG-CoA シンターゼ阻害剤、

c) スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、

d) プロブコール、

e) ナイアシン、

f) ゲンフィブロジル、

g) クロフィブレート及び

h) LDL-レセプター遺伝子誘導物質

【化 1】

からなる群から選択されるコレステロール低下剤の非毒性の治療的に有効な量と組合わせた請求項 1 記載の化合物の非毒性の治療的に有効な量からなる医薬組成物。

【請求項 7】 高コレステロール血症の治療方法であって請求項 1 記載の化合物の非毒性の治療的に有効な量をそのような治療を必要としている患者に投与することからなる方法。

【請求項 8】 真菌増殖の阻止方法であって増殖が抑制されるべき領域に請求項 1 記載の化合物の抗真菌的に有効な量を使用することからなる方法。

【請求項 9】 ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ及び癌遺伝子タンパク質 Ras を阻害する方法であって請求項 1 記載の化合物の治療的に有効な量をそのような治療を必要としている患者に投与することからなる方法。

【請求項 10】 Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々 H である請求項 1 記載の化合物の製造方法であってトリコデルマ・ビリデ (ATCC 74084) 又はその変異株を該化合物の生成に適した条件下で培養し、化合物を回収することからなる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】 高コレステロール血症はアテローム性動脈硬化症のような心血管系疾患の主要な病因要素の 1 つであることが知られている。胆汁酸吸収剤はこの症状を治療するために用いられており、やや有効のようであるが、大量即ち一時に数グラムを消費せねばならず美味とはとても言えない。

【0002】 現在市販されている MEVACOR (商品名) (ロバスタチン) 及び ZOCOR (商品名) (シンバスタチン) は酵素 HMG-CoA 還元酵素を阻害することによりコレステロール生合成を制限することによって機能する強力な抗高コレステロール血症剤群の薬剤である。スクアレンシンターゼ (スクアレンシンターゼとも呼ばれる) はデノボのコレステロール生合成経路の最初の関連段階に関与する酵素である。この酵素は 2 分子のファルネシルピロリン酸の還元的二量化を触媒してスクアレンを生成する。コレステロールに向けたこの前駆段階の阻害がユビキノ、ドリコール及びイソペンテニル t-RNA への生合成経路を妨害してはならない。

【0003】 スクアレンシンターゼを阻害しようとするこれまでの試みは P. Ortiz de Montellano 等、J. Med. Ch

em. 20, 243 (1977), E. J. Corey, R. Volante, J. Am. Chem. Soc. 98, 1291 (1976) 及び S. Biller の米国特許第 5, 025, 003 号に記載されるピロリン酸又はピロリン酸類縁体含有化合物を使用するものであった。S. Biller の米国特許第 4, 871, 721 号はスクアレニンシターゼの阻害剤としてイソプレノイド (ホスフィニルメチル) ホスホネートを記載している。米国特許第 5, 096, 923 号、同第 5, 026, 554 号及び同第 5, 102, 907 号及び 1990 年 3 月 21 日出願の米国特許出願第 496, 734 号及び 1991 年 5 月 10 日出願の同第 698, 766 号はスクアレニンシターゼ阻害剤として有効なリンを含まない置換 2, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン誘導体を、1991 年 5 月 17 日出願の米国特許出願第 701, 922 号はスクアレニンシターゼ阻害剤として有効な置換キスクリジニルオキサジアゾールを記載している。更に、J. Antibiotics 45: 639-658 (1992) はスクアレスタチンについて記載している。

【0004】最近ではリンを含まないスクアレニンシターゼの阻害剤である天然産物のあるもの及びそれらのエステルが真菌増殖を阻止するのに有効であることが示されている。この有用性は米国特許第 5, 026, 554 号に記載される。本発明は真菌増殖を阻止するためのスクアレニンシターゼ阻害剤である構造式 (1) の化合物の用途に関する。

【0005】本発明はまた癌遺伝子タンパク質 Ras のファルネシルを阻害するためのファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤としての構造式 (1) の化合物の用途、及び癌治療に関する。Ras 遺伝子は大腸癌、外分泌腺癌及び骨髄性白血病を含む多くのヒト癌において活性化していることが見出されている。Ras 作用の生物学的及び生化学的研究により Ras が細胞膜に局在し、細胞をトランスフォームするためには GTP と結合しなければならないので Ras が G 調節タンパク質のように作用することが示されている (Gibbs, J. 等, Microbiol. Rev. 53: 171-286 (1989))。癌細胞における Ras 形態は変異しておりそのタンパク質は正常細胞における Ras と区別される少なくとも 3 つの翻訳後修飾が Ras 膜の局在化と関係しており、この 3 つの修飾は全て Ras の C 末端で起こる。Ras C 末端は "CAAX" 即ち、"Cys-Aaa¹-Aaa²-Xaa" ボックス (Aaa は脂肪族アミノ酸であり、Xaa はどのアミノ酸でもよい) と呼ばれる配列モチーフを含む (Willumsen 等, Nature 310: 583-586 (1984))。このモチーフを有する他のタンパク質としては Rho、真菌配偶因子、核ラミン及びトランスデューシンの γ サブユニットのような Ras 関連 GTP 結合タンパク質がある。

【0006】イソプレノイドファルネシルピロリン酸

(FPP) による Ras のファルネシル化は生体内では Cys 上で起リチオエーテル結合を生成する (Hancock 等, Cell, 57: 1167 (1989); Casey 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8323 (1989))。更に Ha-Ras 及び N-Ras は C 末端ファルネシル受容体近傍の Cys 残基でチオエステルの生成を経てパルミトイル化される (Gutierrez 等, EMBO J. 8: 1093-1098 (1989); Hancock 等, Cell 57: 1167-1177 (1989))。Ki-Ras はパルミトート受容体の Cys がない。Ras C 末端基の最後の 3 アミノ酸はタンパク質分解的に除去され、メチルエステル化が新しい C 末端で生じる (Hancock 等, 前出文献)。真菌配偶因子及び哺乳動物核ラミンは同一の修飾段階を通る (Anderegge 等, J. Biol. Chem. 263: 18236 (1988); Farnsworth 等, J. Biol. Chem. 264: 20422 (1989))。

【0007】Ras ファルネシル化の生体内阻害はロバスタチン (Merck & Co. Rahway, NJ) 及びコンバクチン (Hancock 等, 前出文献; Casey 等前出文献; Schafer 等, Science 245: 379 (1989)) を用いて示されている。これらの薬剤は律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害するが、この酵素はポリイソプレノイド、及びファルネシルピロリン酸前駆体を生成する酵素である。前駆体としてファルネシルピロリン酸を用いるファルネシルタンパク質トランスフェラーゼが Ras ファルネシル化に関与していることが示されている。Reiss 等, Cell, 62: 81-88 (1990); Schaber 等, J. Biol. Chem. 265: 14701-14704 (1990); Schafer 等, Science, 249: 1133-1139 (1990); Manne 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 7541-7545 (1990)。

【0008】ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼを阻害してそれによる Ras タンパク質のファルネシル化を阻害すると Ras が正常細胞を癌細胞にトランスフォームできなくなる。驚くことに本発明の化合物は Ras ファルネシル化を阻害して可溶性 Ras を生成させ、下記で示されるように Ras 機能の有力な負の阻害剤として作用することができる。癌細胞中では可溶性 Ras は有力な負の阻害剤になることができるが、正常細胞中の可溶性 Ras は阻害剤とはならない。細胞質に局在化し (Cys-Aaa¹-Aaa²-Xaa ボックス膜ドメインは存在しない) 活性化された (GTPase 活性が欠損しているため、GTP に結合したままである) Ras の形態は膜結合 Ras 機能に対する有力な負の Ras 阻害剤として作用する (Gibbs 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6630-6634 (1989))。正常な GTPase 活性を有する Ras の細胞質局在化形態は阻害剤として作用しない。Gibbs 等 (前出文献) はアフリカツメガエル卵母細胞及び哺乳動物細胞におけるこの効果を示している。

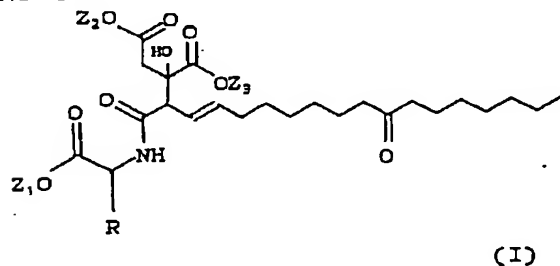
【0009】 Ras フアルネシル化を遮断するために本発明の化合物を投与すると膜中の Ras 量を減少させるばかりでなく Ras が細胞質中に蓄積してくる。活性化 Ras を有する腫瘍細胞では、細胞質プールは膜結合 Ras 機能に対するもう 1 つの拮抗剤として作用する。正常な Ras を有する正常な細胞では Ras の細胞質プールは拮抗剤として作用しない。フアルネシル化を完全に阻害しないときはフアルネシル化されたタンパク質は機能し続けることができる。フアルネシルタンパク質トランスフェラーゼ活性は化合物用量を調節することによって低下又は完全に阻害される。化合物用量を調節することによってフアルネシルタンパク質トランスフェラーゼ酵素活性を低下させることはこの酵素を利用する他の代謝過程を妨害するような望ましくない副作用の可能性を避けるのに有効である。

【0010】これらの化合物はフアルネシルタンパク質トランスフェラーゼの阻害剤である。フアルネシルタンパク質トランスフェラーゼは Ras CAAX ボックスの Cys チオール基をフアルネシル基と共有結合的に修飾するのにフアルネシルピロリン酸を利用する。HMG-CoA 還元酵素の阻害によるフアルネシルピロリン酸合成の阻害は生体内で Ras 膜局在化を遮断し Ras 機能を阻害する。フアルネシルタンパク質トランスフェラーゼの阻害は更に特異的であり、イソプレニン合成の一般的阻害剤の場合よりも副作用を伴わない。

【0011】既に CAAX 配列を有するテトラペプチドが Ras フアルネシル化を阻害することは実証されている (Schaber 等、前出文献: Reiss 等、前出文献: Reiss 等、PNAS、88: 732-736 (1991))。しかし報告されたフアルネシルトランスフェラーゼの阻害剤は細胞内で代謝的に不安定であるか不活性である。本発明の化合物を含有する医薬組成物及びフアルネシルタンパク質トランスフェラーゼ及び癌遺伝子タンパク質 Ras のフアルネシル化を阻害するこれらの組成物を使用する治療方法が本明細書に記載される。本発明はスクアレニンターゼのリンを含まない阻害剤を提供する。

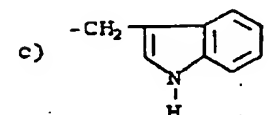
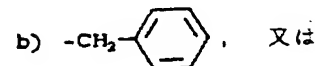
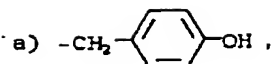
【0012】以下本発明を詳細に説明する。本発明はスクアレニンターゼ阻害剤である構造式 (I) :

【化 3】



【式中 R は

【化 4】



であり; Z_1 、 Z_2 及び Z_3 は独立して

a) H

b) C_{1-5} アルキル又は

c) i) フェニル又は

ii) メチル、メトキシ、ハロゲン (Cl、Br、F、

I) 又はヒドロキシで置換されたフェニルで置換された C_{1-5} アルキルである) を有する新規な化合物又は式

(I) の化合物の薬学的に許容しうる塩に関する。

【0013】下位化合物の 1 つは R が p-ヒドロキシベンジルである化合物である。この下位化合物の具体例は Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々水素である化合物又はその薬学的に許容しうる塩である。R が p-ヒドロキシベンジルであり、 Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々水素である化合物を以後化合物 A と呼ぶ。更にこの下位化合物の例示としては R が p-ヒドロキシベンジルであり Z_1 、 Z_2 又は Z_3 の 1 個以上が C_{1-5} アルキル、置換基がメチル、メトキシ、ハロゲン又はヒドロキシである置換フェニル又はフェニルで置換された C_{1-5} アルキルである化合物である。特定の具体例としては R が p-ヒドロキシベンジルであり、 Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々メチルである。この化合物を以後化合物 B と呼ぶ。別の下位化合物は R がベンジルである化合物である。この下位化合物の具体例は R がベンジルであり Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々水素である化合物又はその薬学的に許容しうる塩である。R がベンジルであり、 Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々水素である化合物を以後化合物 C と呼ぶ。更にこの下位化合物の例示としては R がベンジルであり Z_1 、 Z_2 又は Z_3 の 1 個以上が C_{1-5} アルキル、置換基がメチル、メトキシ、ハロゲン又はヒドロキシである置換フェニル又はフェニルで置換された C_{1-5} アルキルである。第 3 の下位化合物は R が $-\text{CH}_2-3\text{-インドリル}$ であり、 Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々水素である化合物又はその薬学的に許容しうる塩である。R が $-\text{CH}_2-3\text{-インドリル}$ であり、 Z_1 、 Z_2 及び Z_3 が各々水素である化合物を以後化合物 D と呼ぶ。更にこの下位化合物としては R が $-\text{CH}_2-3\text{-インドリル}$ であり Z_1 、 Z_2 又は Z_3 の 1 個以上が C_{1-5} アルキル、置換基がメチル、メトキシ、ハロゲン又はヒドロキシである置換フェニル又はフェニルで置換された C_{1-5} アルキルである化合物である。

【0014】式 (I) の化合物はトリコデルマ・ピリデ

(*Trichoderma viride*) Pers. として同定された新規な真菌培養株 MF 5628 又はその変異株を使用する好氣的発酵方法で製造される。変異株とはゲノム上のある遺伝子が修飾されている微生物であって、式 (1) の化合物を回収可能な量で生産するための微生物の能力に關与する遺伝子又は遺伝子群は機能し遺伝しているものをさす。トリコデルマ・ビリデは世界中の多くの土壌及び有機基質に存在する一般的で地理的に広く分布している微生物である。培養株 MF 5628 はミクロネシア連邦、ポンペイ（以前にはアセンション島）のコロニアで採集した土壌から単離した真菌、トリコデルマ・ビリデ Pers. である。この培養株はブタベスト条約の規約に基づき 1991 年 7 月 30 日に ATCC 74084 として 12301 パークラウンドドライブ、ロックビル MD 20852 のアメリカンタイプカルチュアコレクションに寄託されている。トリコデルマ属の中でこの菌株は、胞子を生じない末端付属器が分生子柄上になく、梗子が長く先細で規則的な樹枝状に配列しており、分生子が大部分球形に近く粗面であるためにトリコデルマ・ビリデ種集合体 (aggregates) に帰属される (Rifai, M. A. 1969, *Revision of the genus Trichoderma*, CMI Mycological Paper 116: 1-56)。

【0015】トリコデルマ・ビリデとして同定された培養株 MF 5628 は下記の形態学的特徴を示す。コロニーは最も標準的な真菌の培地で急速に發育する。コーンミール、寒天、麦芽エキス寒天又はオートミール寒天では 27℃ において 48 時間で 40-45 mm に達し約 5 日間で 9 cm プレートをおおう。まず麦芽エキス寒天のコロニーは透明から白色でまばらからゆるい羊毛状で成熟すると分生子形成のために暗黄緑色から暗緑色、Dark Green, Park Yellowish Green であり、裏面はオリーブイエローから Light Yellowish Olive である（大文字で始まる色名は Ridgway, R. 1912, *Color Standards and Nomenclature*, Washington, D. C. による）。コーンミール寒天では分生子柄が束状になり、透明な菌糸ゾーンと交互に同心性の輪を形成する。麦芽エキス及びオートミール寒天では分生子柄は寒天表面上に均一に發育する。

【0016】菌糸は透明、有隔、滑壁であり、幅 2.6-3.8 μm 、厚膜胞子を形成し、これは球形から垂球形で滑かで直径 5.7-9.5 μm である。分生子柄はコロニーの表面から発生し、しばしばクッション状の分生子のイボとして凝集し、1 本又は 2-3 本がまとまって対生あるいは輪生配列としてひんばんに広角分岐し、分岐は頂端に向かって長さが短くなり梗子で終わる。分生子発生細胞は内分芽型、梗子状で細いフラスコ形で細長く、頂端で細くなっており、5.7-9.5 \times 2 μm 、まっすぐかわずかに湾曲しており、単一または 2-3 個のグループをなし、分生子分岐に対して広い角度に出ており、規則的な樹枝状を形成し、決して一緒に密に集合しない。分生子はほぼ球形から卵形で 3.0-4.

5 \times 2.6-3.0 μm 、KOH で淡緑色を呈しわずかに粗面で梗子の尖端で房状に集積している。

【0017】本発明の化合物は資化される炭素源及び窒素源を含む水性栄養培地中で好ましくは好氣的条件下で上記微生物を培養することによって得ることができる。栄養培地は鉍酸塩及び消泡剤も含んでよい。栄養培地中の好ましい炭素源はグルコース、グリセリン、スターチ、デキストラン等の炭水化物である。マルトース、マンノース、スクロース等の他の炭素源も含まれる。更にオート麦粉、コーンミール、キビ、コーン等の複合栄養源は使用しうる炭素である。用いられる炭素源の正確な量は幾分培地中の他の成分に左右されるが、通常は 0.5-5 重量%の範囲にある量である。これらの炭素源は別々に用いられ、一つの培地中に数種組合せて用いることができる。

【0018】好ましい窒素源はグリシン、メチオニン、プロリン、トレオニン等のアミノ酸及び酵母エキス（加水分解物、自己分解物）、乾燥酵母、トマトペースト、大豆ミール、ペプトン、コーンステープリカー、ディスティラズソリュブル、麦芽エキス等の複合源である。アンモニウム塩（例えば硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等）のような無機窒素源も使用することができる。種々の窒素源は単独あるいは併用した状態で培地中で 0.2-70 重量%の範囲にある量で使用することができる。炭素源及び窒素源は一般的に併用して用いられるが、純粋な形である必要はない。發育因子、ビタミン及び鉍酸栄養源を微量に含む純粋でない物質も使用される。また炭酸カルシウム、リン酸ナトリウム又はカリウム、塩化ナトリウム又はカリウム、マグネシウム塩、銅塩、コバルト塩（これらに限定されない）等の鉍酸塩も培地に加えられる。またマンガ、鉄、モリブデン、亜鉛等の微量金属も含まれる。更に必要な場合、特に培地の泡立ちが深刻である場合ポリエチレングリコール又はシリコンのような消泡剤が加えられる。

【0019】本発明の化合物の好ましい生産方法は産生微生物の胞子又は菌糸を適切な培地に植菌し、次いで好氣的条件下で培養することからなる。式 (1) の化合物は MF 5628 (ATCC 74084) 培養株の好氣的発酵から単離される。MF 5628 (ATCC 74084) の培養株とは実質的にその天然土壌混入物がなく構造式 (1) の化合物を回収しうる量で生成することができるものとして定義される。MF 5628 (ATCC 74084) の生物学的に純粋な培養株も用いられる。

【0020】発酵法は一般的にまず保存培養源を栄養種培地に植菌し、しばしば 2 段階で、活性化合物の生産に種菌として使用する微生物を増殖させるものである。植菌後、フラスコを 20-30℃ 好ましくは 25-28℃ の温度で攪拌しながらインキュベートする。攪拌速度は 400 rpm まで、好ましくは 200-220 rpm であ

る。種フラスコは2-10日、好ましくは2-4日かけてインキュベートする。通常2-4日で十分に生育が起ったらこの培養を用いて生産培地フラスコに接種する。特に大きな容器へ移す場合第2段階の種菌増殖物が用いられる。これを行なう場合、培養増殖物の一部を第2の種フラスコに接種するために用い同様の条件下で時間を短くしてインキュベートする。植菌後、発酵生産培地を攪拌して又はせずに（液体又は固形発酵培地を使用するかどうかによる）3-30日好ましくは6-22日かけてインキュベートする。発酵は20-40℃の温度で好氣的に行なわれる。攪拌する場合には200-400rpmの速度が用いられる。最適な結果を得るには温度範囲は22-28℃、最も好ましくは24-26℃である。活性化化合物の生産に適切な栄養培地のpHは3.5-8.5、最も好ましくは5.0-7.5である。所望化合物の生産に適切な期間の後、発酵フラスコを回収し、活性化化合物を単離する。エステル又はケトンのようなアルコール性又は酸化溶媒が本発明の化合物を固形発酵培地から抽出するために用いられる。固形発酵の抽出に好ましい溶媒はメチルエチルケトン（MEK）である。溶媒と発酵培地の混合液を激しく攪拌し濾過する。得られたMEK層をヘキサンで洗浄し、真空中で濃縮乾固してアニオン交換クロマトグラフィーにかける。好ましい樹脂はBio Rad AG4-X4（アセテート）である。カラムを6:4のアセトニトリル（CH₃CN）：水で洗浄し化合物を酸性溶液で溶離する。好ましい溶出液は0.16N硫酸を含む6:4のCH₃CN：水である。溶出液を酢酸エチルで抽出し、濃縮して粗化合物を得る。

【0021】更に逆相高圧液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）を用いて精製される。このクロマトグラフィーに好ましい吸着剤はオクタデシルシラン結合相シリカゲルである。RP-HPLCに好ましい溶離液は例えば0.1%リン酸又はトリフルオロ酢酸で低いpHに緩衝化した水とアセトニトリルの混合液である。

【0022】更に高速向流クロマトグラフィーを用いて精製することもできる。好ましい溶媒系はヘキサン：酢酸エチル：メタノール：0.1%水性リン酸（5:5:5:5）の混合液である。好ましい装置はP. C. Inc（Potomac, Maryland, USA）によって製造されたITO多層-コイルであるが他の向流クロマトグラフィー装置も用いられる。

【0023】化合物A、C又はDのエステルは化合物A、C又はDを乾燥有機溶媒好ましくはテトラヒドロフラン（THF）に0-30℃で溶解し、適切に置換されたイソウレアで8-24時間処理し、そのウレアを濾過することによって調製される。濾液を減圧下で濃縮して所望のエステルを得る。

【0024】本発明はまた構造式（1）によって示される化合物の非毒性の治療的に有効な量及びその薬学的に許容しうる塩をそのような治療を必要としている患者に

投与することからなるコレステロール生合成阻害の方法に関する。詳細には、本発明の化合物はヒトにおいて抗高コレステロール血症剤として、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、家族性高コレステロール血症及び類似疾患の治療に有効である。これらはカプセル、錠剤、注射用製剤として経口又は非経口投与される。通常経口経路を使用することが望ましい。投与量はヒト患者の年令、重篤度、体重及び他の条件によって異なるが、成人に対する日用量は約20-2000mg（好ましくは20-1000mg）の範囲内であり、2-4回に分けて投与される。これより多い投与量は必要に応じて有利に用いられる。

【0025】更に本発明は酵素スクアレンシンターゼの阻害方法であって構造式（1）によって示される化合物の非毒性の治療的に有効な量及びその薬学的に許容しうる塩をこのような治療を必要としている患者に投与することからなる方法に関する。詳細には本発明の化合物はヒトにおける抗高コレステロール血症剤としてアテローム性動脈硬化症、高脂血症、家族性高コレステロール血症及び類似疾患の治療に有効である。これらはカプセル、錠剤、注射用製剤等として経口又は非経口投与される。通常経口経路を使用することが望ましい。投与量はヒト患者の年令、重篤度、体重及び他の条件によって異なるが成人に対する日用量は約20-2000mg（好ましくは20-1000mg）の範囲内であり、2-4回に分けて投与される。これより多い投与量は必要に応じて有利に使用される。

【0026】本発明の化合物の薬学的に許容しうる塩はナトリウム、カリウム、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、亜鉛のようなカチオンおよびアンモニア、エチレンジアミン、N-メチル-グルタミン、リシン、アルギニン、オルニチン、コリン、N-N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、ジエタノールアミン、プロカイン、N-ベンジルフェネチルアミン、ジエチルアミン、ピペラジン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン及び水酸化テトラメチルアンモニウムのような塩基から生成されるものを含む。本明細書で含まれる塩はカルボキシル基の1、2又は3個全てが塩であるものを含む。これらの塩は標準的方法によって調製される。

【0027】本発明の化合物はまたコレステロール生合成の生合成経路において別の酵素を阻害するような他のコレステロール低下剤と併用して投与することもできる。そのような薬剤の具体例としてはHMG-CoA還元酵素阻害剤、HMG-CoAシンターゼ阻害剤及びスクアレンエポキシダーゼ阻害剤があるがこれらに限定されない。そのようなHMG-CoA還元酵素阻害剤の具体例はロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン及びフルバスタチンである。HMG-CoAシンターゼ阻害剤の具体例は米国特許第4,806,564号、同

第4, 816, 477号、同第4, 847, 271号及び同第4, 751, 237号に開示されるβ-ラクトン誘導体、米国特許第4, 983, 597号及び1990年6月20日出願の米国特許出願第07/540, 992号に開示されるβ-ラクタム誘導体及び欧州特許公報第0411703号に開示される置換オキサシクロプロパン類縁体である。スクアレニエポキシダーゼ阻害剤の具体例は欧州特許公報第0318860号及び日本特許公報第02169-571A号に開示される。LDL-レセプター遺伝子インデューサー分子は1991年3月18日出願の米国特許出願第07/670, 640号に開示される。投与される他のコレステロール低下剤としてはナイアシン、プロブコール、フィブリン酸：クロフィブレート及びゲンフィブロジル及びLDL-レセプター遺伝子インデューサーがある。このような代表的な併用剤は式(1)の化合物約10-400mg及びHMG-CoA還元酵素阻害剤約20-100mg、HMG-CoAシンターゼ阻害剤20-200mg又はスクアレニエポキシダーゼ阻害剤1-200mg又はプロブコール250-1000mg又はゲンフィブロジル600-1200mg又はクロフィブレート1-2g又はナイアシン3-6g又はLDL-レセプター遺伝子インデューサー20-300mgを含むものである。

溶液

	容量 (ml)
1. アール塩類及びL-グルタミンを含むMEM (Gibco #320-1090AK)	1000
2. ペニシリン (10,000単位/ml)、 ストレプトマイシン (10,000mg/ml)、 Gibco #600-5140PG	10
3. MEMビルビン酸ナトリウム、10mM (100×) Gibco #320-1140	10
4. MEM非必須アミノ酸 10mM (100×) Gibco #320-1140AG	10
5. L-グルタミン、200mM (100×)、 Gibco #320-5030AG	10
6. 特定Hyclone ウシ胎児血清、Hyclone #A-111-L	100

【0031】継代培養：培地を除去し、PBS (リン酸平衡化食塩水15.6mM、pH7.0)で洗浄した。トリプシン (0.25%) - EDTA (0.02%) を含む新しいハンス液を加え、フラスコを1分間放置した後トリプシンを除去した。細胞が離れるまでフラスコを37℃でインキュベートした。新しい培地を加え、細胞を分散させ、新しいフラスコに分配した。

継代培養比：1：6。

脱脂血清の調製：ウシ胎児血清 (100ml) 及びCAB-O-Sil (2g) を4℃で一晩攪拌し、16,000rpmで5時間遠心した。上清をろ過してから血清は4℃で保存した。10%ウシ胎児血清を含むMEM中で生育した細胞を10%脱脂血清を含むMEMに移して48時間後に細胞を回収した。

【0028】本発明の化合物はまた胃腸管に再吸収されない形で胆汁酸を結合することができる薬学的に許容しうる非毒性のカチオンポリマーと併用投与できる。そのようなポリマーの具体例としてはコレスチラミン、コレスチボール及びポリ〔メチルー (3-トリメチル) アミノプロピル〕イミノ-トリメチレンジハライドがある。本発明の化合物とこれらのポリマーの併用投与の相対量は1：1000と1：15,000 (w/w) のあいだである。

【0029】本発明の代表的な化合物の固有のスクアレニシンターゼ阻害活性は下記の標準的試験管内プロトコールによって測定した。

ヒトHep G2細胞酵素の調製

1. 原料：HEPG2細胞系 (肝臓、肝芽腫、ヒト) ATCC No. HB8065
2. 細胞培養及び維持
培養基：非必須アミノ酸、ビルビン酸ナトリウム及び10%ウシ胎児血清を含む最少必須培地 (MEM)。培地は1週間に2回交換した。1週間で集密単層を得た。下記に示される増殖培地を調製した。

【0030】

【表1】

回収：培地を取り出し、細胞をPBSで洗浄した。トリプシン (0.25%) - EDTA (0.02%) を含む新しいハンス液を加えて放置した後除去した。細胞が離れるまでフラスコを37℃でインキュベートした。MEM培地 (6ml/フラスコ) を加えて細胞を浮遊させ、遠心管中に集めた。細胞を1,000rpmで5分間遠心した。細胞ペレットをPBSに再浮遊させ、再遠心した。細胞を計数 (18フラスコ (75cm²) から2.5×10⁹ 生じる) し、5mMMgCl₂、2mMnCl₂、10mMDTT、pH7.5を含む50mMHEPES (N-〔2-ヒドロキシエチル〕ピペラジン-N'-〔2-エタンスルホン酸〕 (酵素懸濁用バッファ) 10mlに再懸濁した。

【0032】細胞抽出物：細胞懸濁液を氷上で2分間超

音波処理（プローブソニケーターセッティング#60、パルス）した。1分間氷上で冷却した後、顕微鏡で見て細胞の90%以上が破壊されるまで音波処理を繰り返した。上清を10,000rpmで10分間遠心し、上清をきれいな試験管に移し20,000rpmで20分間遠心した。HepG2酵素標品を34,000rpmで遠心して細胞質及びミクロソーム酵素を分けた。スクアレンシンターゼを含有する34,000rpm遠心により得られた沈降物を酵素懸濁用バッファ5mlに再懸濁した。酵素懸濁液を希釈し、基質として3 μ M³H-ファルネシルピロリン酸を用いるスクアレンシンターゼアッセイを行うために使用した。

【0033】酵母酵素の調製

S. セレビシエ (*S. cerevisiae*) W303-1A (MATa ade2-1 can1-100 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1) を30℃で24時間アデニン20 μ g/mlを加えたYPD培地（2%酵母エキス、1%バクトーペプトン、2%グルコース）中で発育させた。細胞を洗浄し、最少量の破壊バッファ（100mMKPO₄、pH7.4、3mMDDTT、1mMPMSF）に再懸濁した。0.5mmガラスビーズ100gの入ったビードービーターセルディスラプター (Biospec Products, Bartlesville, OK) の小チェンバーに細胞を加えた。チェンバーにバッファを一杯になるまで加え、密閉したチェンバーのまわりに氷を詰め、サイクルの間に2分間の冷却期間を置き30秒で4サイクル処理した。位相差顕微鏡により細胞破壊を測定すると>90%であった。ガラスビーズをワットマン濾紙で除去し濾液を氷浸フィルターフラスコに集めた。抽出液を1500xg、4℃で10分間遠心した。破壊されない細胞及び細胞壁を含有する沈降物（P1）を捨てた。上清（S1）を30000xg、4℃で30分間遠心した。沈降物（P2）は全スクアレンシンターゼ活性の約2/3を含有した。上清（S2）を100,000xg、4℃で60分間遠心すると残りの活性（P3）を沈

降させることができる。沈降物画分を25%グリセリンを含有する破壊用バッファに10-20mg/mlタンパク質となるよう懸濁させた。活性は-80℃において数ヶ月間安定であった。

【0034】スクアレンシンターゼアッセイ

反応は8本の1.2mlポリプロピレン管で行なった。全容量0.140ml中標準的反應混合液はHEPES-Na+バッファpH7.5 50mM、NADPH1mM、MgCl₂ 5.5mM、KF11mM、DTT3mM、タービナフィン（酵母スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、Sandoz SF86-327）又は哺乳類スクアレンエポキシダーゼ阻害剤（Banyu FW-439H）1 μ g/ml、ファルネシルピロリン酸（FPP）5 μ M（NEN）、3H-ファルネシルピロリン酸0.25 μ Ci（NEN、20Ci/ミリモル）、酵素標品として0.1 μ g酵母タンパク質又は0.4 μ gHepG2タンパク質及び試験試料含むDNSO5 μ lを含有させた。FPP/3H-FPPを除く全アッセイ成分を30℃で12分間ブレインキュベートして阻害剤を酵素に結合させた。FPP/3H-FPPを加えて反応を開始させた。30℃で12分後エタノール0.2mlを加えて反応を停止させた。反応生成物をキャリアスクアレン0.4 μ lを含有するヘプタン0.4mlで抽出した。ヘプタン抽出液0.2mlを液体シンチレーションで計数した。IC₅₀は薬剤力価測定によるデータの対数曲線から求めた対照（阻害剤を含まない）酵素活性の50%を示す阻害剤の濃度として求めた。阻害%は下記式によって算出する：

$$\{ (\text{対照} - \text{試料}) / (\text{対照} - \text{ブランク}) \} \times 100$$

 IC₅₀値は阻害%に対する試験化合物の濃度の対数をプロットすることによって求めた。IC₅₀はこれらのプロットから求めた50%阻害を示す阻害剤の濃度である。下記は本発明の化合物の固有スクアレンシンターゼ阻害活性のIC₅₀の代表例である。

【0035】

【表2】

スクアレンシンターゼ阻害
IC₅₀ (μ g/ml)

化合物	酵母酵素	HepG2 酵素
化合物A	7.5	41.6
化合物C	1	19.3
化合物D	0.22	0.29

【0036】また本発明の微生物の発酵で生成される化合物の固有スクアレンシンターゼ阻害活性は下記の標準的試験管内プロトコールによって測定される。

【0037】ラット肝ミクロソームの調製

雄のCHARLES RIVER CDラット（120~150g）に0.1%ロバスタチンを含有する食餌を4日間与えた。これらのラットからの肝臓を氷冷50mM HEPES（4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジン-エタンスルホン酸）1.5mMEDTA（エチレン

ジアミン四酢酸）pH7.5 5容量（ml/g）中でポッターエルベム型組織粉砕機を用いてホモジナイズした。ホモジネートを20,000xg、4℃で15分間2回遠心し、そのつど沈降物を捨てた。次いで上清を100,000xg、4℃で1時間遠心した。得られたミクロソーム沈降物をもとのホモジネートの1/5量に等しい上記ホモジナイズ用バッファに再懸濁させた。このミクロソーム標品はタンパク質濃度約7mg/mlを有する。このミクロソーム浮遊液を分注して-70℃で貯蔵した。

これらのスクアレニンターゼ活性は少なくとも数ヶ月間安定である。

【0038】プレニルトランスフェラーゼの部分的精製
放射能標識ファルネシルピロリン酸の酵素合成に使用するためにプレニルトランスフェラーゼを精製した。プレニルトランスフェラーゼはRilling (Methods in Enzymology 110, 125-129 (1985)) の方法でアッセイし、活性単位を標準的アッセイにおいて30℃1分当たり1μモルのファルネシルピロリン酸を生成する酵素量として定義する。5%コレステラミンと0.1%ロバスタチンを与えて飼育した23匹の40日令雄ラットの肝臓を0.1トリプシン阻害単位のアプロチニン1mlを含有する下記組成の液1L中に入れワーキングブレンダーでホモジナイズした。10mMメルカプトエタノール、2mMEDTA、25mMロイペプチン、0.005%フェニルメチルスルホニルフルオリドpH7.0。ホモジネートを20,000xgで20分間遠心した。上清を6N H₂OAcでpH5.5に調整し、100,000xgで1時間遠心した。この上清を3N KOHでpH7.0に調整し、35-60%硫酸アンモニウム沈澱画分をとった。この60%沈澱物を10mMリン酸カリウム、10mMメルカプトエタノール、1mMEDTA pH7.0 (バッファA) 60mlに再溶解し、バッファA 1リットルを2回交換して透析した。この透析画分をバッファAで平衡化したDEAE-セファロース4Bの12.5×5cmカラムに加えた。カラムをバッファA 700mlで洗浄し、さらにバッファAから100mMリン酸カリウム、10mMメルカプトエタノール、1mMEDTA、pH7.0までの1リットル勾配で洗浄した。0.20単位/mg以上の比活性を有する画分を合わせ、固形硫酸アンモニウムを60%飽和になるように加え、沈降させた。この沈降物を10mMトリス、10mMβ-メルカプトエタノールpH7.0 (バッファB) 8mlに溶解した。再溶解した沈降物をバッファB中の飽和硫酸アンモニウム1.5容量を加えることによって硫酸アンモニウム60%飽和とした。この硫酸アンモニウム懸濁液は3.5単位/mlを含み、比活

性0.23単位/mgであり、イソペンテニルピロリン酸イソメラーゼ活性を含まなかった。この硫酸アンモニウム懸濁液を〔4-¹⁴C〕ファルネシルピロリン酸の合成に使用し、その活性は4℃で少なくとも6ヶ月間は安定であった。

【0039】〔4-¹⁴C〕ファルネシルピロリン酸の酵素合成

溶媒 (エタノール: 0.15N NH₄OH, 1:1) を55mCiの〔4-¹⁴C〕イソペンテニルピロリン酸 (47.9mCi/ミリモル) からロータリーエバポレーターによって除去した。これに100mMトリス、10mMMgCl₂、4mMジチオスレイトールpH7.5の600μlを加え、この溶液を1.5mlのエッペンドルフ遠心管に移した。ゲラニルピロリン酸20mM溶液250μl及びフェニルトランスフェラーゼの硫酸アンモニウム浮遊液50μlを反応を加えて反応を開始させた。このインキュベーションは900μl容量中5ミリモルのゲラニルピロリン酸、1.15ミリモルのイソペンテニルピロリン酸、6ミリモルのMgCl₂及び0.18単位のプレニルトランスフェラーゼを含有した。インキュベーションは37℃で行なった。インキュベーション中新しく生成されたファルネシルピロリン酸のマグネシウム複合体が溶液から沈殿するにつれて混合液が白色に濁った。〔4-¹⁴C〕ファルネシルピロリン酸をエッペンドルフ遠心管で14,000rpm 3分間遠心して集め、上清を除去し、沈降物を50mMHEPES、5mMEDTA pH7.5 1.0mlに溶解した。収量は50.7mCi (92%)の〔4-¹⁴C〕ファルネシルピロリン酸であった。〔4-¹⁴C〕ファルネシルピロリン酸を分注して-70℃で貯蔵した。

【0040】スクアレニンターゼアッセイ

反応は16×125mmのねじ蓋試験管で行なった。バッチャアッセイ混合液を下記溶液から調製した。

【0041】

【表3】

	1アッセイ当たりのml	50アッセイの容量
1. 250mMHEPES pH7.5	20	1000
2. NaF 110mM	10	500
3. MgCl ₂ 55mM	10	500
4. ジチオスレイトール 30mM	10	500
5. NADPH 10mM (用時調製)	10	500
6. 〔4- ¹⁴ C〕ファルネシルピロリン酸 47.9mCi/ミリモル、 及び0.025mCi/3.0ml	3.0	150
7. H ₂ O	24	1200

【0042】このアッセイ混合液を真空下で脱気し、N₂でフラッシュした。スクアレニンターゼ阻害剤の溶液をDMSO又はMeOHで調製し、ミクロソームタンパク質の1:120希釈液を最初のホモジナイズ用バッ

ファを用いて調製した。各反応用アッセイ混合液87μlを阻害溶液3μl (対照としてDMSO又はMeOH) と取り、水浴中で30℃に温め、次いでミクロソームタンパク質の1:120希釈液 (アッセイ中のタンバ

ク質合計 0.6 mg) を加えて反応を開始した。20 分後 40% KOH と 95% EtOH の 1:1 混合液 100 μ l を加えて反応を停止した。停止した混合液を 65℃ で 30 分間加熱し、冷却した。ヘプタン 10 ml を加え、混合液を攪拌した。次いで活性アルミナ 2 g を加え、混合液を再度攪拌し、アルミナを沈降させ、ヘプタン層 5 ml を取り出した。シンチレーション液 10 ml をヘプタン液

化合物

化合物 A

【0043】本発明の化合物はまた液体培地希釈法によって定量される広範囲抗真菌スペクトル活性を示す。これらの化合物はカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 及びウスチラゴ・ゼエ (*Ustilago zeae*) を含む糸状菌及び酵母に対して特に活性である。糸状菌及び酵母の感受性はマイクロタイター方式の阻害剤希釈アッセイを用いて求めた。化合物を DMSO に 2 mg/ml で溶解し、DMSO 100 μ l で希釈した。接種菌が 1 \times 対数増殖期のカンジダ、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 及びウスチラゴ細胞を新しい YNB/G (2% グルコースを加えた Difco Yeast Nitrogen Base) 及び YCB/Glu (2 mM 1-グルタミン酸を含む Difco Yeast Carbon Base) で希釈して 10⁴ 細胞/ml とした。アスペルギルス

に加え放射能を液体シンチレーション計数によって求めた。阻害%は下記式によって算出する:

$$1 - \{ [\text{試料-ブランク}] / [\text{対照-ブランク}] \} \times 100$$

下記データは本発明の化合物のスクアレンシンターゼ阻害特性の代表例である。

【表 4】

スクアレンシンターゼ

1 C50

15 μ M

胞子は十分に孢子形成された Sabouraud Dextrose Agar 斜面から Tween 80 で回収し、接種菌 1 \times 10³ 孢子/ml を得るように培地で希釈した。ウェルを接種済培地 150 μ l で満たした。試験される最終薬剤濃度は 40 ~ 0.313 μ g/ml の範囲にあった。マイクロタイタープレートで 29℃ で 20 ~ 48 時間インキュベートした。最小阻止濃度 (MIC) は酵母に対して 29℃ で 20 時間、糸状菌に対して 29℃ で 24 ~ 48 時間インキュベーション後に肉眼で認められる増殖が起らない最低濃度として定義する。下記に示される最小阻止濃度データは抗真菌活性の代表例である。

【0044】

【表 5】

最小阻止濃度 (μ g/ml)

微生物	培地	A	C	D
カンジダ・アルビカンス	YNB/G	40	>40	>40
MY1055	YCB/Glu	5	2.5	20
クリプトコッカス・	YNB/G	40	>40	40
ネオフォーマンス MY2061	YCB/Glu	1.25	1.25	10
クリプトコッカス・	YNB/G	>40	>40	>40
ネオフォーマンス MY2062	YCB/Glu	2.5	5	10
ウスチラゴ・ゼエ	YNB/G	5	10	20
MF1996	YCB/Glu	1.25	2.5	2.5
アスペルギルス・	YNB/G	>40	>40	>40
フミガッス MF4839	YCB/Glu	0.625	0.625	1.25

【0045】このように本発明はまた真菌増殖の阻止方法であって式 (1) の化合物の抗真菌的に有効な量を増殖が制御されるべき領域に使用することからなる方法に関する。更に本発明は真菌感染症の治療方法であって構造式 (1) によって示される化合物及びその薬学的に許容しうる塩の非毒性の治療的に有効な量をそのような治療を必要としている生物に投与することからなる方法に関する。抗真菌治療の場合、一般的に 2 から約 20 mg/kg が単位用量として使用しなければならないことが、上記 MIC データに基づいて決定される。本発明の化合物は抗真菌組成物の種々の応用において使用されるのに適応することができる。そのように使用する場合化合物は生物学的に不活性な担体と一般的には界面活性分散剤の助剤と共に混和されるがその種類はその用途が人間のような哺乳類又は鳥類又は爬虫類に感染する病原体の制御

用か土壌又は植物関係のような農業における真菌の制御用かあるいは無生物における真菌の制御用であるかによって異なる。

【0046】治療用組成物の場合、化合物は薬学的に許容しうる担体と混和されその種類は組成物が局所、非経口又は経口用であるかによって異なる。適用が局所用である場合、薬剤は白色ワセリン、無水ラノリン、セチルアルコール、コールドクリーム、グリセリルモノステアレート、ローズ水等の従来のクリーム剤及び軟膏に処方される。非経口用の場合化合物は水中 0.85% 塩化ナトリウム又は 5% デキストロースのような従来の非経口液剤又は他の薬学的に許容しうる組成物に処方される。経口投与用組成物は液体製剤の場合水、グリコール、オイル、アルコール等の液状担体及びカプセル剤、錠剤のような固形製剤の場合、デンプン、砂糖、カオリン、エ

チルセルロース、界面活性分散剤のような固形担体を含む任意の通常の医薬媒体と一般的にはステアリン酸カルシウムのような滑沢剤と、結合剤、崩壊剤等と緊密に混合して調製される。次いでこれらの組成物は所望の抗真菌作用を十分得る量で投与される。治療の場合、方法は式 I の化合物の治療的に有効な抗真菌量を治療を必要としている患者に投与することからなる。適切な投与量は年令、重篤度、体重及び他の条件によって異なる。局所用の場合、組成物は制御が所望される面に直接塗布される。内科的投与の場合、組成物は注射によるか又は経口的に投与される。

【0047】非医療用の場合、本発明の生成物は単独で又は混合物として微細乾燥又は液状希釈剤、増量剤、充填剤、コンディショナー及び賦形剤例えば種々のクレー、ケイソウ土、タルク等、又は水及び低級アルコール、例えばエタノール及びイソプロパノール又はクロセン、ベンゼン、トルエン及び他の石油留分又はその混合物のような種々の有機液体を含む不活性担体中に組成物として使用される。これらの組成物は防御される媒体の表面に使用するか取り込むことによって使用される。米のいもち病、トマト疫病、トマト輪紋病、小麦の赤さび病、豆のうどんこ病及びトマトの萎ちょう病 (*Fusarium Wilt*) の防御の場合、組成物は局所的に植物に直接使用するか、全身用に土壤に投与される。この方法は式 I の化合物の抗真菌的に有効な量を防御される被害植物、土壤又は媒体に投与することからなる。式 I の化合物はまた下記に示されるようにファルネシルトランスフェラーゼ阻害を示す。

【0048】ファルネシルトランスフェラーゼアッセイ

1. アッセイに必要な溶液の調製

i. 1. 0M $MgCl_2$ (MW=203.3)

$MgCl_2$ 203.3 g を蒸留水 1.0 リットルに溶解

試薬	貯蔵濃度	使用容量/アッセイ	20 μ l の濃度	アッセイの最終濃度
3 H-FPP	25 μ M	0.2 μ l	0.25 μ M	50 nM
無標識 FPP	2000 nM	11.25 μ l	1.125 μ M	225 nM
ras-CVLS	1 mg/ml (47.62 μ M)	6.3 μ l	15 μ M	3 μ M
d-H ₂ O		2.25 μ l		
全容量		20 μ l		

【0050】またブランク反応混合液は負の対照 *ras*-タンパク質を用いて調製し全体/試料反応混合液に *ras*-CVLS を加えた。表 1 のブランク反応混合液を調製するためにこの容量を使用した。

viii. ファルネシルトランスフェラーゼ溶液の調製

試薬	貯蔵濃度	使用容量/アッセイ
d-H ₂ O		14.0 μ l
バッファ	貯蔵液=10X	10.0 μ l
F. トランスフェラーゼ	貯蔵液=1 mg/ml	1.0 μ l

し滅菌フィルターで濾過し、4℃で貯蔵した。

ii. 1. 1M HEPES (MW=238.3) 及び 5. 5mM $MgCl_2$

蒸留水 700 ml に HEPES 264.5 g を加え、次に 1.0M $MgCl_2$ 56 ml を加えた。水酸化ナトリウムで pH を 7.5 に調整し、容量を 1000 ml とした。この溶液を滅菌フィルターで濾過し 4℃で貯蔵した。

iii. 0.5M ジチオスレイトール (DTT, MW=154.24)

DTT 77.12 mg を蒸留水 1.0 ml に溶解した。DTT が溶液になるように 10N NaOH を 2、3 滴加えた。0.5M DTT を 500 μ l ずつに分け、-20℃で貯蔵した。

iv. アッセイバッファの調製 (毎日新しく調製)

1.0M HEPES、pH 7.5、5.0mM $MgCl_2$ 及び 5.0mM DTT からなる 10X バッファを得るために 0.5M DTT 100 μ l を 1.1M HEPES、pH 7.5 及び 5.5mM $MgCl_2$ 900 μ l に加えた。

v. 非標識ファルネシルピロリン酸 (FPP) の調製

非標識 FPP (MW=433.3) は 1.8mM (1mg/1.28ml) 溶液として入手した。この溶液を水で 2 μ M に希釈し、毎週新しく調製し -20℃で貯蔵した。非標識 FPP を調製する場合ガラス管を使用した。

vi. 3 H-FPP の調製

3 H-FPP (NEN #NET-1042, MW=433.3) は NEN から入手したビンから直接使用した。

3 H-FPP の貯蔵濃度は 25 μ M であった。

vii. 全体及び未知試料用反応混合液の調製 (氷上)

反応混合液を下記のように調製した：

【0049】

【表 6】

下記に示すようにファルネシルトランスフェラーゼ溶液を調製した。ファルネシルトランスフェラーゼ混合液を使用直前に調製した。

【表 7】

全容量

ix. 100%エタノール中1.0M HClの調製
エタノール中1.0M HClを得るために濃HCl
(11.6M) 43mlを100%エタノール457mlと
混合することによって停止用溶液を調製した。

【0051】V. アッセイのステップ

- i. アッセイ容量は100 μ lとし、試験される試料の
容量は5 μ lとし、インキュベーション時間は室温で6
0分である。
- ii. オートマチックピペッティングステーション (TE
CAN8000/505) により水50 μ lと試料5 μ
lをアッセイ管に加えた。
- iii. ras-CVLS反応混合液(20 μ l)を全体及
び未知試料に手で加えた。負の対照ras-タンパク質
反応混合液(20 μ l)をブランク管に手で加えた。
- iv. 反応を開始させるためにファルネシルトランスフェ
ラーゼ混合液(25 μ l)を全アッセイ管に手で加え、
アッセイ管を室温で60分間保持した。
- v. アッセイ管を氷浴に5分間入れて反応を停止させ
た。
- vi. 次いで100%エタノール中1.0M HCl
1.0mlを各管に加えた。FPPの加水分解を促進する
ためにアッセイ管(蓋なし)を37℃で60分間インキュ
ベートした。
- vii. TOMTEC96-ウェルハーベスター(先端を伸
長した6 \times 16のもの又はSKATRONセルハーベス
ター)によってLKB2倍厚フィルターマットにアッセ
イ管の内容を回収した。
- viii. 細胞ハーベスターを調整して各ウェルを100%
エタノール10mlで洗浄した。
- ix. フィルターマットを乾燥するためにフィルターマッ
トをマイクロ波オーブンで6-8分加熱した。
- x. フィルターマットを計数バックに入れLKB β -シ
ンチカクテル30mlを加え、フィルターマットをLKB
 β -プレートカウンターで120秒間計数した。

【0052】VI. 結果及び検討

下記等式に従って阻害%を算出した：

$$\text{阻害}\% = \left\{ \frac{[\text{全体}-\text{試料}]}{[\text{全体}-\text{ブランク}]} \right\} \times 100$$

下記に示されるファルネシルトランスフェラーゼデータ
は試験化合物が試験管内でRasファルネシル化を阻害
する能力の測定値である。

【表8】

化合物	IC ₅₀ (μ M)
化合物A	8
化合物C	4.5
化合物D	3.3

【0053】構造式(1)の化合物を含有する医薬組成
物はファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ及び
癌遺伝子タンパク質Rasのファルネシル化を阻害す

25 μ l

る。これらの化合物は哺乳動物特にヒト用の医薬剤とし
て有効である。これらの化合物は癌の治療に使用するた
めに患者に投与される。本発明の化合物で治療される癌
の種類の例としては大腸癌、外分泌腺癌及び骨髄性白血
病があるがこれらに限定されない。本発明の化合物は単
独で又は好ましくは標準的な医薬実施に従って医薬組成
物として薬学的に許容しうる担体もしくは希釈剤、場合
によってはミョウバンのような既知のアジュバントと組
合わせて哺乳動物好ましくはヒトに投与される。化合物
は経口又は非経口投与することができ、静脈内、筋肉
内、腹腔内、皮下及び局所投与を含む。

【0054】本発明による化学療法化合物を経口使用す
る場合、選択された化合物は例えば錠剤あるいはカプセ
ル剤として又は水溶液あるいは懸濁液として投与され
る。経口使用の場合、錠剤に通常使用される担体として
はラクトース及びコーンスターチが挙げられステアリン
酸マグネシウムのような滑沢剤が通常加えられる。カプ
セルとして経口投与する場合には有用な希釈剤としてラ
クトース及び乾燥コーンスターチが挙げられる。経口使
用するのに水性懸濁液剤が必要な場合には活性成分は乳
化剤及び懸濁化剤と組合わせて用いられる。希望する場
合には一定の甘味剤及び/又は香味剤も加えられる。筋
肉内、腹腔内、皮下及び静脈内使用の場合活性成分の滅
菌溶液が通常使用され、液のpHは適切に調整され且つ緩
衝化されなければならない。静脈内使用の場合、溶質の
全濃度は溶液が等張になるように調節されなければならない。

【0055】本発明はまた癌の治療方法であって薬学的
に許容しうる担体又は希釈剤と共にあるいは単独で本発
明の化合物の治療的に有効な量からなる医薬組成物を投
与することからなる方法を含む。本発明の適切な組成物
としては本発明の化合物及び薬理学的に許容しうる担体
例えば食塩水をpHレベル例えば7.4にしたものからな
る水性液剤が挙げられる。液剤はボラス局所注入によっ
て患者の筋肉内血流に導入される。本発明による化合物
をヒトに投与する場合日用量は通常患者の年齢、体重及
び応答によって変更されるのが普通であり、また患者の
症状の重さの程度を考慮して処方する医師により決定さ
れる。1つの典型的な応用例としては化合物の適切な量
が癌の治療を受ける患者に投与される。投与は1日約
0.1-20mg/kg哺乳動物体重、好ましくは1日約
0.5-10mg/kg哺乳動物体重のあいだとなる量であ
る。下記実施例は式(1)の化合物の製造及び医薬組成
物への混合を具体的に説明するがこのままで本明細書に
添えられている特許請求の範囲に示される発明を限定す
るものとして解釈されるべきではない。

【0056】下記実施例で使用される培地の組成を以下
に挙げる：

【表9】

KF種培地		微量元素ミックス#2	
	1リットル当たり		g/リットル
コーンステープ	5 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	1. 0
リカー			
トマトペースト	40 g	MnSO ₄ · 4H ₂ O	1. 0
オート麦粉	10 g	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0. 025
セレロース	10 g	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0. 1
微量元素ミックス#2	10 ml	H ₃ BO ₃	0. 056
蒸留水	1000 ml	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0. 019
pH6. 8に調整(滅菌前)		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0. 2
50 ml/バッフル付きでない			
250 ml三角フラスコ		0. 6N HCl	1リットルに溶解する
20分オートクレーブにかける			
(121℃、15 psi)			

固形基質生産培地

固形基質培地はバッフル付きでない250 ml三角フラスコ中で調製する

B R F

玄米 5. 0 g/フラスコ

基礎液体#3 20. 0 ml/フラスコ

基礎液体#3

	g/リットル
酵母エキス	1. 0
酒石酸ナトリウム	0. 5
KH ₂ PO ₄	0. 5
蒸留水	1000. 0 ml

(pH調整なし)

15分オートクレーブにかける(121℃、15 psi)

蒸留水15. 0 ml/フラスコを加える

20分オートクレーブにかける(121℃、15 psi)

【0057】

【実施例】実施例1化合物Aの製造A. MF5628の培養

滅菌した土壤中で保存した菌糸及び孢子の混合物を用い、MF5628株を3KF種培地フラスコに植菌した。このKF種フラスコを25℃、220 rpm、湿度85%で74時間インキュベートした。このインキュベーションの終わりに3本の種フラスコからの培養増殖をブールし次に50本のB R F固形生産培地フラスコの各々に2. 0 mlずつ無菌的に移した。次いでこれらの生産フラスコを25℃、湿度85%で21日間静的にインキュベートした。回収時に各B R F生産フラスコにメチルエチルケトン(MEK)50 mlを加え、固形増殖物を手で小片にほぐした。更に菌塊を細くした溶媒と細胞の接触を良くするために溶媒処理フラスコを旋回振盪機に戻し220 rpmで30分間アジテーションした。振盪後、フラスコの全内容物(固形分及び全部)を2リットルの

フラスコに注ぎ入れてこれらのフラスコの内容物をブールした。

【0058】B. 化合物Aの単離

上記B R F培地中の21日固形発酵を室温で更に1. 5時間攪拌しながらメチルエチルケトン(MEK)250 mlで抽出した。次いで抽出発酵をセライト(商品名)で濾過した。MEK抽出液の一部(300 ml)を真空中で濃縮乾固した。得られた残留物をヘキサン50 mlとメタノール50 mlで分配した。メタノール層を真空中で濃縮乾固した。残留物を1:1のMeOH:100 mM NaOAc、pH4. 8 100 mlに溶解し、再びヘキサン50 mlで抽出した。次いで水性メタノール層を1:1のMeOH:100 mM NaOAc pH4. 8 (平衡バッファ)で平衡化したBio Rad、AG4-X4 (アセテート)

(容量=28 ml、25 mm×50 mm、100-200メッシュ)のカラムに150 ml/時間で負荷した。次いでカラムを平衡バッファ100 ml次に6:4のアセトニトリル(CH₃CN):H₂O 100 mlで洗浄した。カラムを0. 16 N硫酸を含む6:4のCH₃CN:H₂Oで溶離して8 mlずつの画分を集めた。粗化合物Aを含有している画分21-30(6. 0-8. 6 カラム容量)をブール(容量=100 ml、pH2. 54)し、酢酸エチル100 mlで抽出した。酢酸エチル層を真空中で濃縮して粗化合物A384 mgを得、これをメタノール20 mlに溶解した。メタノール中の粗化合物Aの一部(5. 2 ml、100 mg)をHPLC移動相1 mlに溶解した。この溶液をWhatman Partisil 10 ODS3(22 mm×25 cm)に0. 1% H₃PO₄を含有する45% CH₃CN/55% H₂Oを20 ml/分で流すクロマトグラフィーにかけた。カラムを220 nmでモニターし、0. 4分(8 ml)で分画した。化合物Aは画分44-49に溶離してきた。分析用HPLC(Partisil 5 ODS3、4. 6 mm×25 cm、0. 1% H₃PO₄を含有する55% CH₃CN/H₂O、流速1. 0 ml/分、220 nmで検出)は画分44-49が実質的に純粋な化合物、tr

= 4. 25' を含むことを示した。画分44-49をブールし、等量(48ml)の CH_2Cl_2 で抽出し、 CH_2Cl_2 層を除去し無水 Na_2SO_4 で乾燥し、真空中で濃縮して純粋な化合物A 20. 6mgを得た。

【0059】実施例2

化合物Cの製造

A. MF5628の培養

培養MF5628を実施例1、工程Aの方法に従って培養した。

B. 化合物Cの単離

実施例1パートBのMEK抽出液1500ml部を化合物Aの調製について記載したようにBio Rad AG4×4で処理して粗化合物A、C及びDの混合物1. 94gを得た。この混合物の一部(0. 95g)をP. C. Inc.

(11805KimPlace, Potomac, Maryland, USA)によって製造された高速向流クロマトグラフィーによって分離した。粗混合液を真空中で濃縮乾固し、ヘキサン5部、酢酸エチル5部、メタノール5部、0. 1%水性 H_3PO_4 5部からなる溶媒系の上相4mlと下相4mlにそれぞれ溶解した。この試料を上記溶媒系の下相で完全に満たした#10分取用多層コイル(P. C. Inc.)の末端に加えた。次いでこのコイルを上記溶媒系の上相を用いてカラムの末端からカラムの先端に3. 0ml/分で前向き回転速度800rpmで溶出した。画分を7. 5mlづつ集め、化合物Aの調製について実施例1パートBで記載したようにRP HPLCによって分析した。画分75-95は化合物C 95mgを含有した。

【0060】実施例3

化合物Dの製造

A. MF5628の培養

MF5628株を実施例1、工程Aの方法に従って培養した。

B. 化合物Dの単離

化合物Dの単離は実施例2に記載したように行なった。高速向流分離の画分120-160は粗化合物D 30mgを含有した。この混合液の半量(15mg)を更に溶液A及びBの1:1混合液を用いて4. 0ml/分で溶出するカラムPhenomenex Ultracarb 5 ODS 30、15cm×10mmカラムによるクロマトグラフィーで精製した。溶液Aはアセトニトリル400ml及び0. 1% H_3PO_4 を含む水600mlであり溶液Bはアセトニトリル750ml及び0. 1% H_3PO_4 を含む水250mlからなる。各々2mlづつ画分を集め番号24-27をブールし、等量の H_2O を加え溶液を等量のEtOAcで抽出した。EtOAc層を真空中で濃縮乾固し、化合物D 10. 2mgを含有した。

【0061】実施例4

アンモニウム塩の製造

式(1)の化合物の遊離酸0. 1ミリモル試料を酢酸エチル10mlに溶解する。得られた液体を気体のアンモニ

アで飽和すると溶液からアンモニウム塩が沈殿する。

【0062】実施例5

カリウム塩の製造

メタノール10ml中に溶解した式(1)の化合物の遊離酸0. 1ミリモルを水酸化カリウム0. 3ミリモルを含有する水性又はメタノール性溶液で処理する。溶媒を蒸発させてトリカリウム塩を得る。水酸化カリウム0. 1-0. 3ミリモルを加えるとそれに対応してモノカリウム、ジカリウム及びトリカリウム塩の混合物を得、この組成は加える水酸化カリウムの正確な量に左右される。同様の方法でナトリウム及びリチウム塩を生成させることができる。

【0063】実施例6

カルシウム塩の製造

式(1)の化合物の遊離酸0. 1ミリモルの6:4のメタノール:水溶液20mlを水酸化カルシウム0. 1ミリモルの水溶液で処理する。溶媒を蒸発させて対応するカルシウム塩を得る。

【0064】実施例7

エチレンジアミン塩の製造

式(1)の化合物の遊離酸0. 1ミリモルのメタノール溶液10mlをエチレンジアミン0. 1ミリモルで処理する。溶媒を蒸発させてエチレンジアミン塩を得る。この方法はN, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩の製造にも使用することができる。

【0065】実施例8

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩の製造

式(1)の化合物の遊離酸0. 1ミリモルのメタノール溶液10mlに、メタノール10mlに溶解したトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン0. 1-0. 3ミリモルを加える。溶媒を蒸発させると対応する塩を得、その正確な組成は加えられるアミンのモル比によって決まる。同様にL-オルニチン、L-リシン及びN-メチルグルタミンの塩が製造される。

【0066】実施例9

L-アルギニン塩の製造

式(1)の化合物の遊離酸0. 1ミリモルの6:4のメタノール:水溶液20mlをL-アルギニン0. 1-0. 3ミリモルの水溶液で処理する。溶媒を蒸発させると標記塩を得、この正確な組成は式(1)の遊離酸に対して用いられるアミノ酸のモル比によって決まる。同様にL-オルニチン、L-リシン及びN-メチルグルタミンの塩が製造される。

【0067】実施例10

化合物B(方法1)の製造

化合物A(0. 6mg)をジエチルエーテル1mlに溶解し、0℃で攪拌した。この溶液が黄色になるまでエーテル性シアナミドを滴下した。この溶液を窒素気流下で蒸発させて化合物Bを得た。化合物C及びDから出発すると上記方法に従って対応するトリメチルエステルが製造

される。

【0068】実施例 11

化合物 B (方法 2) の製造

化合物 A 5 mg を含むメタノール (5 ml) に新しく蒸留したジアソメタン (2.05 M) を含むエーテル 2 ml を加えた。5 分後溶媒を除去するとトリメチルエステル (化合物 B) を油状物として得る。化合物 C 及び D から出発すると上記方法に従って対応するトリメチルエステルが製造される。

【0069】実施例 12

化合物 B (方法 3) の製造

化合物 A 5 mg を含むテトラヒドロフラン (THF) 0.5 ml を 3 当量の N, N'-ジイソプロピル- α -ベンジルイソウレアで室温において 18 時間処理する。次いで反応混合液を -15℃ に冷却し、濾過してウレアを除去する。濾液を減圧下で濃縮して化合物 B を得る。実施例 12 の方法はまた適切に置換されたイソウレアを用いる 1) メチル及び他の低級アルキル及び 2) 置換ベンジルエステルのような他のエステル誘導体の製造に適している。用いられる置換イソウレアの当量数を変更することによってモノ、ジ及びトリ置換エステルが選択的に製造される。実施例 10 の方法はまた化合物 C 及び D のモノ、ジ及びトリ置換エステルの製造に適している。

【0070】質量スペクトルデータ

Finnigan-MAT モデル MAT 212 (電子衝撃、E1、90 eV) 及び TSQ 70B (高速原子衝撃、FAB、E1、70 eV) 質量分析計により質量スペクトルを記録した。正確な質量測定は内部標準としてパーフルオ

ロクロセン (PFK) を用い、高分解能 (HR-EI) で行なった。FAB モードはマトリックスとして酢酸リチウムで処理した 5:1 のジチオスレイトール/ジチオ-エリスリトール (DTT/DTE、陰イオンモード) DTT/DTE 及び酢酸で処理したチオグリセリン (陽イオンモード) を用いた。

^{13}C NMR データ

Varian XL-300 分光計により CD_3OD 中 75 MHz の ^{13}C NMR スペクトルを記録した。ケミカルシフトは内部標準として 49.0 ppm (CD_3OD) の溶媒ピークに相対する ppm として示す。

^1H NMR スペクトル

Varian XL-300 分光計により 300 MHz の ^1H NMR スペクトルを記録した。ケミカルシフトは内部標準として 3.30 ppm の溶媒ピークに相対する ppm として示す。

【0071】構造 I の化合物の物理的性質

化合物 A-構造 (I) の R が p-ヒドロキシベンジルであり、Z₁、Z₂ 及び Z₃ が各々水素である化合物。

質量スペクトルデータ

この化合物は FAB-MS (m/z 590 に [M-H]⁻ 及び m/z 592 に [M+H]⁺ が見られる) により分子量 591 を有する。分子式はトリメチルエステルの正確な質量測定によって求めた ($\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_8$ に対する計算値 583.3145 M- ($\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$)、実測値 583.3131)。

【化 5】

^1H -nmr (300 MHz, CD_3OD 0.7 ml 中 18 mg) : δ 0.90 (t, 7.3H), 1.29 (m, 14H), 1.53 (m, 4H), 1.98 (m, 2H), 2.44 (t, 7.2, 4H), 2.62 (d, 16.3, 1H), 2.89 (dd, 8.7, 13.3, 1H), 2.91 (d, 16.3, 1H), 3.11 (dd, 5.3, 14.3, 1H), 3.22 (d, 8.5, 1H), 4.61 (dd, 5.0, 8.7, 1H), 5.5 (m, 2H), 6.68 (d, 8.8, 2H), 7.03 (d, 8.8, 2H).

^{13}C -nmr (75 MHz, CD_3OD 0.7 ml 中 18 mg) : δ 14.42, 23.68, 24.83, 24.91, 29.83, 29.88, 30.06, 30.26, 30.29, 32.89, 33.46, 37.50, 43.10, 43.49 (2), 55.08, 57.77, 77.93, 116.21 (2), 124.52, 128.71, 131.38 (2), 137.56, 157.38, 173.55, 173.83, 174.48, 175.75, 214.62.

UV - (CH_3OH 中 100 $\mu\text{g/ml}$) : 225 nm (8050), 277 nm (1420).

【0072】化合物 B-化合物 A のトリメチルエステル即ち構造 (I) の R が p-ヒドロキシベンジルであり、Z₁、Z₂ 及び Z₃ が各々メチルである化合物。

質量スペクトルデータ

この化合物は FAB-MS により分子量 633 を有する (m/z 640 に [M+Li]⁺ がある)。

【化 6】

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD 0.7ml 中 0.6mg) : δ 0.901 (t, 7.6), 1.295 (m), 1.536 (m), 1.992 (M), 2.439 (t, 7.3), 2.588 (d, 16.3), 2.865 (dd, 9.6, 14.3), 2.932 (d, 16.2), 3.073 (dd, 5.4, 14.2), 3.220 (d, 8.1), 3.641 (s), 3.709 (s), 3.716 (s), 4.610 (dd, 5.5, 8.7), 5.515 (m), 6.671 (d, 9.0), 6.988 (d, 8.1).

【0073】化合物C—構造(1)のRがベンジルであり、Z₁、Z₂及びZ₃が各々水素である化合物。 り分子量575を有する。
【化7】

質量スペクトルデータ：この化合物はFAB-MSによ

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD 0.5ml 中 6.2mg) : δ 0.90 (t, 7, 3H), 1.29 (brm, 14H), 1.53 (m, 4H), 1.97 (m, 2H), 2.44 (t, 6.6, 4H), 2.56 (d, 16, 1H), 2.88 (d, 16, 1H), 2.98 (dd, 9.4, 14.3, 1H), 3.24 (s, 14.3 1H), 4.69 (dd, 4.9, 9.4, 1H), 5.54 (m, 2H), 7.24 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD 0.5ml 中 6.2mg) : δ 14.41, 23.67, 24.81, 24.92, 29.84, 29.88, 30.08, 30.25, 30.29, 32.89, 33.46, 38.24, 42.98, 43.48 (2), 54.81, 57.90,

【化8】

77.90, 124.49, 127.88, 129.45 (2), 130.38 (2), 137.50, 138.18, 173.49, 173.79, 174.28, 175.63, 214.50.

【0074】化合物D—構造(1)のRが—CH₂—3—インドリルであり、Z₁、Z₂及びZ₃が各々水素である化合物。 この化合物はFAB-MSにより分子量614を有する。
【化9】

質量スペクトルデータ

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD 0.7ml 中 10.2mg) : δ 0.90 (t, 6.3, 3H), 1.29 (m, 14H), 1.51 (m, 4H), 1.94 (m, 2H), 2.40 (t, 7.4, 2H), 2.42 (t, 7.4, 2H), 2.60 (d, 16.0, 1H), 2.90 (d, 16.0, 1H), 3.21 (d, 6.7, 1H), 3.22 (dd, 6.7, 14.5, 1H), 3.35 (dd, 4.9, 14.5, 1H), 4.76 (dd, 4.9, 8.0, 1H), 5.53 (m, 2H), 6.97-7.11 (m, 2H), 7.10 (s, 1H), 7.31 (brd, 8.0, 1H), 7.56 (brd, 7.6, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD 0.7ml 中 10.2mg) : δ 14.42, 23.68, 24.79, 24.90, 28.38, 29.76, 30.02, 30.25, 30.28, 32.89, 33.39, 43.06, 43.46, (2), 54.33, 57.74, 77.98, 110.63, 112.29, 119.33, 119.80, 122.39, 124.46, 124.61, 128.72, 137.68, 138.01, 139.49, 173.49, 173.85, 174.85, 175.67, 214.59

UV (MeOH 中 100 $\mu\text{g/ml}$) : 221 nm, 274 nm, 281 nm 及び 290 nm.

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 907730
(32) 優先日 1992年7月9日
(33) 優先権主張国 米国(US)

(72) 発明者 ガイ エッチ. ハリス
アメリカ合衆国, 07016 ニュージャーシ
ィ, クランフォード, シャドウローン ウ
エイ 308

- (72) 発明者 リーユアン フアング
アメリカ合衆国, 07060 ニュージャージー
ィ, ウォッチュング, ウィル レーン 33
- (72) 発明者 ロザリンド エフ. ジェンキンス
アメリカ合衆国, 08873 ニュージャージー
ィ, ソマーセット, ラファイエット アヴ
ェニュー 81
- (72) 発明者 イー. トレイシー ターナー ジョーンズ
アメリカ合衆国, 92075 カリフォルニア,
ソロナビーチ, ハイランド ドライヴ
805
- (72) 発明者 ユー リン コング
アメリカ合衆国, 08820 ニュージャージー
ィ, エジソン, ブライアント アヴェニュー
57
- (72) 発明者 マリア サンドリノ メインツ
アメリカ合衆国, 08873 ニュージャージー
ィ, ソマーセット, アボット ロード 24
- (72) 発明者 メアリ ナリン オムステッド
アメリカ合衆国, 07934 ニュージャージー
ィ, グラッドストン, ディア バス 13

- (72) 発明者 マリア テレサ ディエス
スペイン国, 28010 マドリッド, シー
ノオリド, 4
- (72) 発明者 フェルナンド ベラエツ
スペイン国, 28038 マドリッド, シー
ノカミノ デ ヴァルデッリバス, 10
- (72) 発明者 ジェームス エー. ミリガン
アメリカ合衆国, 08859 ニュージャージー
ィ, パーリン, パークウェイ プレイス
8
- (72) 発明者 ジャネット シー. オニシ
アメリカ合衆国, 07092 ニュージャージー
ィ, マウンテンサイド, チェリー ヒル
ロード 350
- (72) 発明者 ラッセル ビー. リングム
アメリカ合衆国, 07060 ニュージャージー
ィ, ウォッチュング, ヨアンナ レーン
5
- (72) 発明者 デボラ ツィンク
アメリカ合衆国, 07726 ニュージャージー
ィ, マナラバン, ブレンハイム ロード
37

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.